

EFEITO DE DOSES DE *Lactobacillus buchneri* “CEPA NCIMB 40788” SOBRE AS PERDAS NOS PERÍODOS DE FERMENTAÇÃO E PÓS-ABERTURA DA SILAGEM DE GRÃOS ÚMIDOS DE MILHO

RICARDO ANDRADE REIS,¹ RUBEN PABLO SCHOCKEN-ITURRINO,² ENEIDA DE OLIVEIRA ALMEIDA,³ ESTELLA ROSSETO JANUSCKIEWICZ,⁴ THIAGO FERNANDES BERNARDES⁵ E ANA PAULA DE TOLEDO PIZA ROTH⁴

1. Professor do Departamento de Zootecnia, FCAV/UNESP
2. Professor do Departamento de Microbiologia, FCAV/UNESP
3. Zootecnista, autônoma
4. Aluna de mestrado da FCAV – Unesp
5. Professor do Departamento de Zootecnia – UFRA

RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do *Lactobacillus buchneri* (cepa NCIMB 40788) nas silagens de grãos úmidos de milho tratadas com quatro doses do inoculante (5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 UFC/g de massa ensilada) mais o grupo-controle. Determinaram-se as perdas durante a fermentação, e durante a exposição aeróbia avaliaram-se os teores de MS, de nitrogênio amoniacal, valores de pH e contagem de fungos e leveduras. Constatou-se que a inclusão do *L. buchneri* nas silagens de grãos úmidos de milho não influenciou os parâmetros avaliados na fermentação, registrando-se valores médios de pH (4,2), perda por gases (2,68%) e por efluente

(2,56 kg/t de silagem) e RMS (98,42%). No entanto, durante a exposição aeróbia, as silagens inoculadas com doses a partir de 1×10^5 UFC/g de massa ensilada mostraram-se mais estáveis, aumentando de 68 h (controle) para 239,3 h (dose de 1×10^5 UFC/g de massa ensilada) o tempo de quebra da estabilidade. A inoculação da silagem de grão úmido de milho com dose de *L. buchneri* de 1×10^5 UFC/g de massa ensilada mostrou-se eficaz no controle de leveduras e fungos e promoveu aumento na estabilidade aeróbia. Doses superiores às supracitadas possuem efeito benéfico, no entanto tem-se de considerar a relação custo-benefício.

PALAVRAS-CHAVES: Aditivos, ensilagem, estabilidade, fermentação, perdas.

ABSTRACT

FERMENTATION AND AEROBIC LOSSES IN CORN GRAIN ENSILED WITH *Lactobacillus buchneri* “NCIMB 40788”

This research was carried out to evaluate the corn grain ensiled with different *Lactobacillus buchneri* (NCIMB 40788) levels (5×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 e 4×10^5 UFC/g of the ensiled corn grains), and control. It was determined the losses during the fermentation and air exposition phases. The DM, and ammonia nitrogen contents, pH values, yeast and fungal populations were determined during the silage fermentation, and air exposition phase. The data were analyzed according to a randomized block design, in a split plot schedule with four replications. The *L. buchneri* utilization did not affect the corn grain fermentation, but

controlled the yeast and fungal growth. It was recorded average pH values (4.2), gas losses (2.68%), and effluent (2.56 kg/t of silage) and RMS (98.24%). However, during the air exposition, the silage inoculated with 1×10^5 CFU/g of mass ensiled) the time to break the stability. The inoculation using *L. buchneri* (1×10^5 UFC/g of corn grain) was efficient on the yeast and fungal growth control, and increased the aerobic stability. However, the highest levels of additive utilization were more efficient, but is necessary to evaluate the economic aspects of this technique.

KEY WORDS: Additives, aerobic stability, ensilage, fermentation, losses.

INTRODUÇÃO

O uso de silagem de grãos úmidos de cereais, especialmente de milho, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Trata-se de uma tecnologia de fácil adoção, com baixos custos de implantação e segurança de resultados. No Brasil, onde normalmente ocorrem grandes desperdícios de grãos, esta técnica poderia reduzir significativamente as perdas na lavoura e na armazenagem na propriedade. Salienta-se também que a colheita do milho úmido para silagem proporciona antecipação na retirada da cultura da lavoura com grandes benefícios num esquema de rotação de culturas, proporcionando redução das perdas quantitativas durante o processo de armazenagem e menor custo de produção em relação ao grão seco. É importante destacar algumas desvantagens, tais como a impossibilidade de comercialização de eventuais excedentes de produção, bem como da confecção do concentrado, antecipadamente, para posterior utilização, pois silagem de grãos úmidos não pode ser misturada aos demais ingredientes da ração e armazenada para distribuição posterior (JOBIM et al., 2001).

Na alimentação de monogástricos, a silagem de grãos úmidos substitui total ou parcialmente os grãos de cereais, que tradicionalmente são armazenados na forma de grãos secos. Esses tipos de silagens vêm sendo pesquisados há vários anos em países da Europa (DEBRABANDER et al., 1992) e nos Estados Unidos (CHANDLER et al., 1974; GOODRICH et al., 1975; PRIGGE et al., 1976), sendo utilizados diretamente na alimentação de várias espécies animais com resultados satisfatórios.

No Brasil, a silagem de grãos úmidos de cereais foi introduzida a partir de 1981, na região de Castro, PR, pelos criadores de suínos e posteriormente na alimentação de bovinos de leite e de corte. A técnica permaneceu restrita a essa região até o início da década de 1990. O processo de confecção da silagem de grãos úmidos de cereais foi extensivamente descrito por COSTA et al. (1999) e JOBIM et al. (2001).

Um aspecto importante a ser ressaltado é a qualidade sanitária da silagem de grãos úmidos de

milho com relação à presença de micotoxinas que podem afetar a qualidade da silagem, prejudicando a saúde animal e resultando em perdas econômicas significativas para os criadores. Nesse sentido, uma das estratégias tem sido a utilização de inoculantes bacterianos, em virtude das perspectivas destes em controlar os eventos microbianos indesejáveis durante a fermentação e principalmente durante a utilização da silagem.

Na literatura, até o presente momento, estudos comparativos para determinar a eficiência do uso de inoculantes bacterianos contendo microrganismos heteroláticos em silagens de grãos úmidos de milho são escassos.

A maioria dos inoculantes bacterianos aplicados em silagens produz primeiramente ácido láctico durante o processo de fermentação. As bactérias homofermentativas mais comumente usadas em inoculantes para silagens são: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus cerevisiae* etc. Esses organismos fazem o pH diminuir durante a fermentação, bem como evitar as perdas da matéria seca e, em alguns casos, melhorar o desempenho animal. Entretanto, os produtos da fermentação das silagens produzidos por inoculantes bacterianos homofermentativos, às vezes, podem resultar em silagens menos estáveis quando expostas ao ar, comparadas às não-inoculadas. Isso ocorre porque o ácido láctico produzido por essas bactérias pode prontamente ser metabolizado por microrganismos indesejáveis que atuam nas silagens quando expostas ao ar (PAHLOW et al., 2003).

O *Lactobacillus buchneri*, isolado originalmente de silagens aerobically estáveis por natureza, é uma bactéria heterofermentativa que produz ácido láctico, acético e 1,2 propanodiol durante a fermentação dos substratos (WEINBERG & MUCK, 1996).

TAYLOR & KUNG JR. (2002), avaliando silagens de grãos úmidos de milho tratadas com doses de *Lactobacillus buchneri*, observaram concentrações de ácido acético de 1,19 e 0,36% da MS, de ácido láctico de 0,95 e 1,05% da MS, nas silagens tratadas com 1×10^6 UFC de *L. buchneri* /g de massa ensilada e nas de controle, respectivamente. Esses valores levaram as silagens tratadas

a terem incremento na estabilidade aeróbia de 84 para 450 h. No entanto, nas condições nacionais, principalmente relacionadas ao custo de utilização desse microrganismo, doses elevadas podem ser inviáveis economicamente.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do *Lactobacillus buchneri* sobre as perdas na fermentação e sobre as alterações físicas e microbiológicas na fase de aerobiose de silagem de grãos úmidos de milho.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolveu-se o experimento na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Campus de Jaboticabal/SP, no Setor de Forragicultura.

Utilizou-se o híbrido de milho AG-7575, colhido quando os grãos completaram a maturidade fisiológica, visualizada pela formação da linha preta na base do grão, ocasião em que cessa a translocação de nutrientes da planta para os grãos e estes apresentam o máximo teor de amido, proteína e óleo, com teor de umidade médio de 30% (JOBIM et al., 2001). O material foi colhido utilizando-se colhedora, modelo 1165 SLC, da marca John Deere, e posteriormente triturado em moinho de martelo sem a presença da peneira, possibilitando apenas a quebra dos grãos, sem a realização de moagem.

Durante a colheita, houve contaminação de partículas de sabugo e, portanto, foram realizadas três amostragens, selecionando-se os grãos de milho e sabugo, obtendo-se como médias dessas frações 92,42 e 8,5%, respectivamente.

Na ensilagem, adotou-se como densidade padrão 1.000 Kg de massa ensilada/m³, conforme preconizado por JOBIM et al. (2001).

Como tratamentos, empregou-se a elevação na concentração da bactéria *Lactobacillus buchneri*, sendo: T1: controle (sem inoculante), T2: 5 x 10⁴, T3: 1 x 10⁵, T4: 2 x 10⁵, T5: 4 x 10⁵ UFC/g de grão de milho úmido, com base na informação do fabricante, que assegura a quantidade de 2,5 x 10¹⁰ UFC/g de produto. A bactéria *Lactobacillus buchneri* (cepa NCIMB 40788), comercializada como Lasil Cana®, foi diluída em solução aquo-

sa e pulverizada buscando distribuição uniforme na massa dos grãos antes do enchimento dos silos. Foram utilizados como silos experimentais baldes de plástico com capacidade de sete litros, com tampa acoplada com válvula de *Bunsen* para escape de gases.

Para avaliação da perda por efluente, colocaram-se no fundo dos silos 2,5 Kg de areia seca e, para evitar contaminação do material, separou-se a areia com uma tela e tecido poroso. Os silos foram vedados com fita adesiva e em seguida pesados e armazenados em temperatura ambiente. No momento da ensilagem, procedeu-se à coleta de uma amostra por silo para posterior análise.

A avaliação das perdas por gases foi determinada pelas pesagens dos silos, após a ensilagem e após 68 dias de fermentação. Calcularam-se as perdas de matéria seca pela diferença entre o peso bruto inicial e o final dos silos experimentais, e a quantidade de efluentes, pela diferença entre o peso inicial e o peso final dos baldes, contendo apenas a areia, a tela e tecido poroso. A recuperação da matéria seca das silagens foi calculada pela relação entre o peso da matéria seca da silagem no dia da abertura e o peso da matéria seca da massa de grãos ensilada.

Após os 68 dias de fermentação os silos foram pesados e abertos, desprezou-se a porção deteriorada da silagem, sendo o restante homogeneizado e amostrado, para determinação dos teores de MS (%) e valores de pH (SILVA & QUEIROZ, 2002).

Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, totalizando vinte baldes. Os dados foram analisados empregando-se o programa de análise estatística Estat, desenvolvido pelo Departamento de Ciências Exatas da FCAV/Unesp, para os procedimentos da análise de variâncias e, para comparação entre médias, empregou-se o teste de Tukey (P>0,05).

Após a abertura dos silos experimentais, retiraram-se amostras, que foram colocadas em duplicata em baldes de plástico com capacidade de sete litros, sendo estes armazenados em câmara climática à temperatura de 25°C, para avaliação da estabilidade aeróbia. Em um dos baldes foram

medidas as temperaturas das silagens, obtidas três vezes ao dia durante quinze dias, por meio de um termômetro inserido na massa de silagem, e caracterizou-se como quebra da estabilidade aeróbia quando a temperatura da silagem ultrapassou em 2°C a temperatura ambiente, segundo a metodologia descrita por TAYLOR & KUNG JR. (2002).

Nas duplicatas dos baldes plásticos, mantidos na câmara climática com a mesma quantidade de silagem, realizaram-se amostragens (0, 5, 10 e 15 dias de aeração) para avaliação dos teores de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3/NT$), de matéria seca (MS) e valores de pH com o uso de potenciômetro, conforme SILVA & QUEIROZ (2002).

As determinações das contagens de leveduras e fungos das silagens no momento da abertura dos silos foram feitas segundo metodologia descrita por JOBIM et al. (1999) e realizadas no Laboratório de Microbiologia da FCAV/Unesp. Coletaram-se amostras aos 0, 5 e 10 dias de aeração.

Para a análise microbiológica, preparou-se extrato de silagem, pesando-se 25 g de silagem de grão úmido de milho e adicionando-se 225 mL de água peptonada a 0,1% bacteriológica (Biolife). Posteriormente, procedeu-se à semeadura em placas de Petri contendo o meio ágar-batata + dextrose (Biolife), acidificado com ácido lático para obtenção de pH 4,0. Incubaram-se as amostras por três dias em aerobiose a 35°C. Também para contagem de mofos, empregou-se o mesmo meio de cultura e a mesma temperatura, sendo a incubação realizada por cinco dias. A diferenciação entre leveduras e fungos foi realizada de acordo com a estrutura física das colônias, sabendo-se que as leveduras são colônias unicelulares, enquanto os mofos são multicelulares filamentosos.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições, mediante a utilização do esquema de parcelas subdivididas, sendo o fator das parcelas as doses do inoculante e o fator atribuído à subparcela o tempo. Os dados foram analisados utilizando-se o programa de análise estatística Estat, pelos procedimentos da análise de variância, e para comparação entre médias empregou-se o teste Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos dados apresentados na Tabela 1, referente aos teores de MS no momento da ensilagem, evidencia que esses não diferiram ($P > 0,05$), proporcionando condições de fermentação semelhantes entre os tratamentos e tendo como média geral 65,33% de MS.

Na abertura dos silos, observou-se diferença entre os teores de MS, e as silagens-controle apresentaram o maior teor (66,54% de MS); no entanto, esse não apresentou diferença ($P < 0,05$) das silagens tratadas com 1×10^5 e 4×10^5 UFC/g de massa ensilada. O menor foi obtido no tratamento com a dose de 2×10^5 UFC/g de grão de milho úmido (64,92%), que, por sua vez, não diferiu das silagens tratadas com 5×10^4 e 1×10^5 UFC/g de massa ensilada (Tabela 1).

Os teores de MS observados neste experimento (65,66%) estão bem próximos aos encontrados por JOBIM et al. (1997) (63,9%). No entanto, foi inferior ao teor de 73,3%, observado por TAYLOR & KUNG JR. (2002), avaliando silagens de grãos úmidos de milho tratadas com *L. buchneri*, que no momento da ensilagem apresentavam cerca de 74% de MS. Apesar da diferença entre os teores observados no presente trabalho e no realizado por TAYLOR & KUNG JR. (2002), a não-ocorrência de variação nos teores de MS da ensilagem em relação à abertura foi comum em ambos os trabalhos.

Os valores de pH, apresentados na Tabela 1, das silagens não diferiram entre si, sendo a média geral de 4,12. Fato semelhante foi observado no estudo de TAYLOR & KUNG JR. (2002), avaliando silagens de grãos úmidos de milho, tratadas com *L. buchneri* até a dose de $6,6 \times 10^5$ UFC/g de grão de milho úmido, e na dose de 1×10^6 UFC/g de grão de milho úmido o valor de pH foi superior. Nas silagens de planta inteira de milho tratadas com *L. buchneri*, geralmente são observados valores de pH mais elevados que naquelas não-inoculadas (DRIEHUIS et al., 1999). Possivelmente, a não-constatação de valores mais altos de pH no caso das silagens de grãos úmidos de milho pode estar associada à concentração de ácido lático comumente observada nas silagens,

menos de 1% na MS (TAYLOR & KUNG JR., 2002), enquanto nas silagens de planta inteira de milho geralmente são encontrados valores de 5% a 7% de ácido láctico (FILYA et al., 2004).

TABELA 1. Médias dos teores de matéria seca, valores de pH e perdas das silagens de grãos úmidos de milho em função das doses de *L. buchneri*

	Doses (UFC/g massa ensilada)					Média	CV(%) ⁵
	Controle	5x10 ⁴	1x10 ⁵	2x10 ⁵	4x10 ⁵		
MS (%) ¹	65,83	65,22	65,33	64,76	65,49	65,33	0,99
MS (%) ²	66,54 a	65,32 bc	65,62 abc	64,92 c	65,89 ab	65,66	0,66
pH	4,1	4,1	4,2	4,2	4,1	4,1	1,42
GAS (%MS)	2,01	2,69	2,99	2,78	2,93	2,68	30,64
EFLU ³	2,30	2,55	2,81	1,54	3,57	2,56	52,98
RMS (%) ⁴	98,27	98,39	98,48	98,29	98,67	98,42	1,20

Médias seguidas de letras iguais nas linhas não diferem pelo teste Tukey (P>0,05)

¹ Matéria seca na ensilagem; ² matéria seca na abertura dos silos; ³ efluente (Kg/t de matéria natural); ⁴ recuperação de matéria seca; ⁵ CV (%): coeficiente de variação.

As percentagens de perdas de gases (Tabela 1) não diferiram estatisticamente, sendo as médias observadas de 2,68%. Esperava-se que, com o aumento da dose de *L. buchneri* aplicada na massa ensilada, houvesse aumento da produção de gases, dada a produção de CO₂ na fermentação pelas bactérias heterofermentativas (OUDE ELFERINK et al., 2001). Essas bactérias possuem a enzima carboxilase necessária para retirar as moléculas de CO₂ do ácido pirúvico, conforme citado por BUTLER & BAILEY (1973); no entanto, a maior produção do gás não foi observada, indicando que o inoculante não prejudicou o processo fermentativo.

Não houve diferença nos valores observados nas perdas por efluentes (P>0,05), tendo como média 2,56 Kg/t de grão úmido de milho ensilado. Segundo HAIG (1999), um dos principais fatores determinantes da produção de efluentes é o teor de MS. No presente estudo os teores de MS na ensilagem não diferiram significativamente (Tabela 1). Vale ressaltar ainda que a utilização de inoculantes provavelmente não afetaria a produção de efluentes.

A média de recuperação da MS foi de 98,42%, não diferindo (P>0,05) entre os tratamentos aplicados. Esses valores foram semelhantes aos encontrados por RANJIT et al. (2002), com média

de 98,5%. TAYLOR & KUNG JR. (2002) também não observaram diferenças nas silagens de grãos úmidos de milho tratadas com *L. buchneri*. No entanto, em silagens da planta inteira de milho, constatou-se a redução da recuperação de MS em vários trabalhos (DRIEHUIS et al., 1999; FILYA, 2003). Os autores consideraram como uma das causas das maiores perdas nas silagens inoculadas com *L. buchneri* a maior concentração de ácido acético. Nessa rota metabólica pode ocorrer a formação de CO₂, que propicia elevação nas perdas de MS. No caso das silagens de grãos úmidos, a fermentação acética é menos intensa, a se considerar o incremento observado por TAYLOR & KUNG JR. (2002), de 0,36% para 1,1% MS de ácido acético, enquanto FILYA (2003) observou elevação de 1% para 4% da MS de ácido acético nas silagens de planta inteira de milho.

Os teores de MS na abertura, ou seja, no dia zero após a abertura, não diferiram estatisticamente em função das doses (Tabela 2). Após cinco dias de aeração, a silagem-controle apresentou o maior teor de MS, não diferindo apenas da dose de 1 x 10⁵ UFC/g. Passados dez dias de aeração, os teores de MS da silagem-controle mostraram-se maiores que os das silagens tratadas (P<0,05), e entre as silagens que receberam o *L. buchneri* não se observou diferença.

Comparando-se os teores de MS (Tabela 2) entre os tempos, observou-se aumento conforme se prolongou a exposição aeróbia das silagens. A maior média entre os tempos foi observada no décimo quinto dia de exposição aeróbia (81,5%), e o menor valor representado no dia zero (65,7%). Esse aumento do teor da MS entre os tempos pode ser explicado pela umidade do ar, que, possivelmente, estava menor que a da silagem, fazendo com que esta perdesse umidade para o ambiente. Independentemente do tempo, observou-se que as silagens-controle apresentaram o maior valor de MS (73,9%) e, no entanto, diferiram apenas das silagens tratadas com a dose de 2×10^5 UFC/g de massa ensilada (71,7%).

Os valores de pH (Tabela 2) no dia da abertura dos silos não apresentaram diferenças entre os tratamentos ($P > 0,05$). Passados cinco dias de aeração, as silagens-controle não diferiram das silagens tratadas com a dose de 5×10^4 UFC/g de massa ensilada e foram superiores às demais silagens. Entre as silagens tratadas, não se evidenciou diferença ($P > 0,05$). Observando-se os valores no décimo dia de exposição aeróbia, constatou-se que as silagens tratadas com as doses de 1 e 4×10^5 UFC/g de massa ensilada foram as únicas que obtiveram diferença das silagens-controle. Já no décimo quinto dia de exposição aeróbia, apenas as silagens tratadas com 4×10^5 UFC/g de massa ensilada mantiveram valores inferiores às silagens-controle.

TABELA 2. Teores de matéria seca (MS), valores de pH e de nitrogênio amoniacal em relação ao nitrogênio total ($N-NH_3/NT$) de silagens de grãos úmidos em diferentes tempos de exposição aeróbia em função das doses de *L. buchneri*

Tempo (dias)	Doses (UFC/g de massa ensilada)					Médias
	Controle	5×10^4	1×10^5	2×10^5	4×10^5	
	MS (%)					
0	66,5 Ca	65,3 Da	65,6 Da	64,9 Da	65,9 Da	65,7
5	69,4 Ca	68,8 Cb	69,4 Cab	68,1 Cb	69,1 Cb	69,4
10	74,3 Ba	74,4 Bb	73,6 Bb	72,2 Bb	73,4 Bb	74,3
15	81,5 Ab	81,1 Aab	83,1 Aa	81,5 Aab	82,2 Aa	81,5
Médias	73,9	72,4	72,9	71,7	72,6	
CV (%)						1,8
	pH					
0	4,1 Ca	4,1 Ba	4,2 Ba	4,2 Ba	4,1 Ba	4,1
5	5,4 Ba	4,2 Bab	4,0 Bb	4,0 Bb	4,0 Bb	4,3
10	6,9 Aa	6,5 Aab	5,4 Abc	6,0 Aabc	5,1 Ac	5,9
15	7,1 Aa	7,0 Aab	6,2 Aab	6,8 Aab	5,9 Ab	6,6
Médias	5,8	5,5	5,0	5,2	4,8	
CV (%)						16,8
	$N-NH_3/NT$ (%)					
0	8,73	6,96	7,95	7,77	9,70	8,1 A
5	7,72	5,90	5,90	4,64	6,20	6,1 B
10	6,83	8,93	6,70	8,19	7,36	7,6 A
15	8,98	7,63	7,82	7,41	9,21	8,2 A
Médias	8,1 a	7,3 a	7,1 a	7,0 a	8,0 a	
CV (%)						19,8

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem pelo Teste Tukey ($P > 0,05$). CV = coeficiente de variação.

A elevação do pH durante a exposição aeróbia das silagens ocorre por causa da degradação dos ácidos orgânicos, principalmente do ácido lático. Essa degradação ocorre pela ação de microrganismos oportunistas, principalmente leveduras e fungos (KUNG et al., 2003). RANJIT & KUNG JR. (2000) observaram redução da concentração do ácido lático de 7,52% da MS para 1,35% em três dias de exposição aeróbia, em silagens de planta inteira de milho. A manutenção do pH, ou seja, menor elevação comparada à das silagens-controle, pode ser atribuída à presença do *L. buchneri*, que é produtor de ácido acético (WEINBERG & MUCK, 1996), e esse, segundo MOON (1983), tem efeito inibitório sobre o crescimento de leveduras e de fungos que são responsáveis pelo consumo de ácido lático.

O maior valor médio de pH foi observado no décimo quinto dia de exposição (6,6), e o menor (4,1), no dia da abertura (Tabela 2). Durante a exposição aeróbia, pela atuação de leveduras e fungos, o ácido lático pode ser consumido, com conseqüente elevação do pH. Esse fato foi observado no estudo de RANJIT & KUNG JR. (2000), que constataram redução do ácido lático de 7,52 para 1,35% da MS durante três dias de exposição aeróbia de silagens de milho sem tratamento.

Analisando os teores de N-NH₃/NT (Tabela 2), o tempo de avaliação que apresentou menor média foi o de cinco dias (6,1%) (P<0,05). Os demais tempos de exposição aeróbia não apresentaram diferenças (P>0,05), sendo as médias 7,1% (dia zero), 8,6% (dia dez) e 8,2% (dia 15). Durante a exposição aeróbia, a determinação dos valores de N-NH₃ é conseqüência do valor existente modificado pela síntese e pela volatilização de amônia. Nesse caso, pode-se inferir que até o quinto dia houve controle de microrganismos oportunistas e a volatilização foi superior à síntese. A partir de dez dias de exposição, provavelmente essa situação se inverteu. Esses dados corroboram os valores de pH observados, em que a elevação do pH ocorre a partir do dia 10. O pH é um dos fatores que controlam microrganismos oportunistas produtores de N-NH₃.

Trata-se de valores que estão acima dos encontrados em silagem de grãos úmidos com

61,4% de MS, citados por DEBRABANDER et al. (1992), que encontraram 2,7% de N-NH₃, enquanto PETIT & VIEIRA (1991) observaram 2,0% de N-NH₃, em silagem de espigas de milho ensiladas com 60,0% de MS. Valores de N-NH₃ superiores indicam degradação de proteína, principalmente por clostrídios durante a fermentação (MCDONALD et al., 1991), fato este não desejável. Nessas silagens foram constatados valores de pH médio de 4,1 no momento da abertura dos silos, valores que também se encontram acima dos observados por DEBRABANDER et al. (1992) (3,7), JOBIM et al. (1997) (3,6), REIS et al. (2001) (3,5) e SANTOS et al. (2002) (3,9). Conseqüentemente pode-se afirmar que no presente estudo houve maior degradação de compostos protéicos, possivelmente em conseqüência da menor redução nos valores de pH.

As silagens-controle e a silagens inoculadas com *L. buchneri* com a dose de 5 x 10⁴ UFC/g de massa ensilada apresentaram valores de quebra da estabilidade aeróbia com os tempos 68 e 126,5 horas, respectivamente (Figura 1). As demais doses de *L. buchneri* não apresentaram diferenças entre si. A instabilidade da silagem foi constatada às 239,3 horas (dez dias de exposição aeróbia) a partir da dose de *L. buchneri* de 1 x 10⁵ UFC/g de silagem, verificando-se, assim, que não houve incrementos significativos no controle da elevação da temperatura nas doses superiores. Com base nessas informações, constata-se que a inoculação de *L. buchneri* em silagens de grãos úmidos de milho com doses inferiores a 1 x 10⁵ UFC/g massa ensilada não mostrou incremento de eficiência no controle da estabilidade aeróbia das silagens, e doses superiores a esta não são viáveis, pelo desperdício de inoculante.

Este fato pode ser explicado, provavelmente, por duas hipóteses. A primeira relaciona-se ao possível incremento de ácido acético formado pelas adições progressivas do inoculante *L. buchneri*, pois este microrganismo é produtor de ácido acético (WEINBERG & MUCK, 1996). Deve-se considerar, contudo, que o ácido acético não teria um efeito linear sobre a atuação no controle de leveduras, fazendo com que a ação dele não surtisse mais efeito, por ter mantido os tempos de estabili-

dade quase constantes ($P > 0,05$). Provavelmente, a quantidade de ácido acético produzida pelo *L. buchneri*, quando aplicado na dose de 1×10^5 UFC/g de massa ensilada, seja a concentração-limite de ácido acético para atuar sobre o metabolismo de leveduras e mofos, ou seja, concentrações superiores não apresentam incrementos sobre o controle de leveduras e mofos. Analisando o trabalho de TAYLOR & KUNG JR. (2002), que avaliaram o efeito de doses do *L. buchneri* de 1×10^5 até 1×10^6 UFC/g massa ensilada na ensilagem e estabilidade aeróbia, verifica-se que, após 166 dias de fermentação, ocorreram incrementos na concentração de ácido acético de 0,56% a 1,19% da MS, respectivamente. Em relação à estabilidade aeróbia, medida em horas para elevação de 2°C , não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nas doses de *L. buchneri* superiores a 5×10^5 UFC/g massa ensilada, mesmo havendo incremento na concentração de ácido acético, que teoricamente seria o controlador da população de fungos (leveduras e mofos). Vale ressaltar que as doses utilizadas no estudo de TAYLOR & KUNG JR. (2002) foram superiores às do presente estudo, o que resguarda a associação direta dos efeitos.

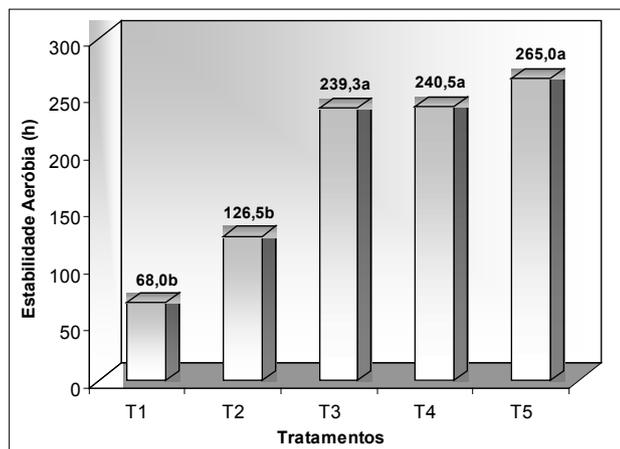


FIGURA 1. Efeito das doses de inoculante bacteriano *L. buchneri* na estabilidade aeróbia (horas).

Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste Tukey ($P > 0,05$).

T1: controle, T2: 5×10^4 , T3: 1×10^5 , T4: 2×10^5 , T5: 4×10^5 UFC/g de massa ensilada.

Outra explicação poderia ser a falta de substratos (carboidratos solúveis) para a atuação

linear do *L. buchneri* na produção de ácido acético. Dessa forma, em vez de terem ocorrido aumentos na concentração de ácido acético, pode ter havido uma estabilização deste a partir da dose de 1×10^5 UFC/g massa ensilada. Segundo JOBIM et al. (1997), os teores de carboidratos solúveis de grãos úmidos no momento da ensilagem podem ser considerados baixos (3,6% na MS). Aliado a este fato, no trabalho de TAYLOR & KUNG JR. (2002), observou-se que os teores de carboidratos solúveis, após sete dias de armazenagem, eram inferiores a 0,2% na MS. Dessa forma, pode-se afirmar que o desenvolvimento do *L. buchneri* possivelmente foi limitado pela ausência de carboidratos solúveis.

Segundo registros de WOOLFORD (1990), há um consenso em relação à importância de leveduras e mofos como principais agentes na deterioração aeróbia das silagens. Pode-se observar (Tabela 3) que no momento da abertura não houve diferença entre a contagem de leveduras das silagens ($P > 0,05$). Numericamente o maior valor foi observado nas silagens tratadas com *L. buchneri* na dose de 1×10^5 UFC/g massa ensilada. Transcorridos cinco dias de aeração, observou-se que as silagens tratadas com a dose de 1×10^5 e 4×10^5 UFC/g de massa ensilada apresentaram diferenças em relação às silagens-controle. As demais silagens tratadas não apresentaram diferenças em relação às silagens-controle. No entanto as silagens tratadas com a dose de 5×10^4 UFC/g de massa ensilada apresentaram diferença numérica bastante expressiva. No décimo dia de exposição, não se registrou diferença entre as silagens ($P > 0,05$).

RANJIT & KUNG JR. (2000), estudando doses de *L. buchneri* e estirpes de *L. plantarum* em silagens da planta de milho, encontraram resultados sobre o efeito do ácido acético, que foi claramente detectado nas silagens tratadas com *L. buchneri* (5×10^5 UFC/g de massa ensilada), acarretando melhora substancial na estabilidade aeróbia da silagem, nas contagens de leveduras ($2,01 \log$ UFC/g de silagem) e mofos ($2,53 \log$ UFC/g de silagem). Avaliando o desenvolvimento de leveduras em silagens de grãos úmidos, JOBIM et al. (1999) encontraram valores de 6,4, 7,1, 7,9

e 8,2 log UFC/g de silagem, observados nos dias 0, 2, 4 e 6 pós-abertura dos silos, respectivamente. Esses valores são semelhantes aos encontrados no presente experimento (Tabela 3).

TABELA 3. Desenvolvimento de leveduras e mofos (log UFC/g de silagem) das silagens de grãos úmidos de milho inoculadas com diferentes doses de *L. buchneri* avaliadas em períodos de exposição ao ar

Tempo (dias)	Doses (UFC/g de massa ensilada)					Médias
	Controle	5x10 ⁴	1x10 ⁵	2x10 ⁵	4x10 ⁵	
Leveduras (log UFC/g)						
0	5,07 aB	5,87 aB	6,39 aB	5,81 aB	6,25 Aa	5,88
5	9,04 aA	8,58 abA	6,61 bB	6,84 abAB	2,74 cB	6,76
10	8,98 aA	9,15 aA	9,22 aA	8,72 aA	8,54 aA	8,92
Médias	7,69	7,87	7,41	7,12	5,84	
CV (%)						20,1
Mofos (log UFC/g)						
0	3,65 aB	4,42 aA	2,85 aB	3,12 aA	3,53 aA	3,51
5	2,11 abB	5,10 aA	1,20 bB	1,77 abB	4,17 abA	2,87
10	7,56 aA	7,56 aA	7,78 aA	4,82 aA	6,33 aA	6,81
Médias	4,44	5,69	3,94	3,24	4,68	
CV (%)						49,6

Médias seguidas de letras iguais minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas não diferem pelo Teste Tukey (P>0,05).

CV = coeficiente de variação

Considerando que silagens com contagem de leveduras superior a 5,0 log UFC/g de silagem são altamente susceptíveis à deterioração (WOOLFORD, 1972; WOOLFORD, 1990), podem-se então classificar as silagens avaliadas no presente estudo como sujeitas à rápida deterioração após a abertura dos silos. Tecnicamente, esse fato implica uma série de cuidados durante a ensilagem e o descarregamento do silo, evitando-se perdas tanto na qualidade como nas quantidades dos grãos ensilados (JOBIM et al., 1999).

Em relação às contagens de mofos no dia da abertura, não foram constatadas diferenças entre as silagens (P>0,05). No quinto dia de exposição aeróbia, as silagens da dose de 5 x 10⁴ UFC/g de massa ensilada apresentaram o maior valor, no entanto diferiram apenas das silagens tratadas com a dose de 1 x 10⁵ UFC/g da massa ensilada. No décimo dia, não se observou diferença entre as silagens (P>0,05). Os resultados referentes ao desenvolvimento de fungos, encontrados neste experimento, são superiores aos registrados por JOBIM et al. (1999) na silagem de espigas de

milho (2,6 log UFC/g de silagem) e na silagem de grãos úmidos de milho (1,9 log UFC/g de silagem). Analisando as médias em relação aos tempos de exposição, pôde-se constatar elevação na contagem de fungos no décimo dia de exposição, semelhante ao observado na população de leveduras (Tabela 3).

Em avaliação de forma conjunta da Figura 1 e da Tabela 3, tem-se a inter-relação entre a população de leveduras e fungos e a temperatura. As silagens-controle e as tratadas com 5 x 10⁴ UFC/g de massa ensilada apresentaram quebra da estabilidade com menos de cinco dias (aproximadamente 120h). Essas silagens apresentaram as maiores populações de leveduras, no entanto as silagens tratadas com 1 x 10⁵ UFC/g de massa ensilada não diferiram estatisticamente das silagens tratadas com 5 x 10⁴ UFC/g de massa ensilada, mas se verifica menor contagem de fungos nas silagens com 1 x 10⁵ UFC/g de massa ensilada. Verifica-se também que, aos dez dias de exposição aeróbia, todas as silagens já tinham apresentado a quebra da estabilidade aeróbia, e essas não apresentaram

diferenças em relação à contagem de leveduras e fungos.

Uma possível explicação para o controle de leveduras e fungos durante a exposição aeróbia, com reflexo sobre a manutenção da temperatura, está fundamentada na inibição desses microrganismos pelo ácido acético (MOON, 1983), no caso, produzido pelo *L. buchneri*. Trata-se de mecanismo descrito por DAVIDSON (1997) (Figura 2). O ácido acético em pH inferior ao seu pK_a (4,73) mantém-se na forma não dissociada, e a membrana de leveduras e fungos é permeável a ele, de modo que, conseqüentemente, a entrada do ácido é realizada via transporte passivo. Dentro das células, ele é dissociado ($RCOO^-$ e H^+) pelo fato de o pH interno do microrganismo ser por volta de 7,0 (superior ao pK_a), liberando íons H^+ , conseqüentemente ocorre rápida redução do pH intracelular. Para elevar novamente o pH, o microrganismo tem de expulsar os íons H^+ , implicando gasto de energia, por se tratar de um processo de transporte ativo, que retarda o crescimento e pode causar a morte celular (McDONALD et al., 1991).

Associando a Figura 2 com os dados obtidos na Tabelas 2 e 3, observa-se a efetividade do controle de fungos (leveduras e mofos) pela ação do ácido acético. As silagens que apresentaram pH inferior ao pK_a do ácido acético (4,73) tiveram o desenvolvimento de fungos (leveduras e mofos) controlado. No dia da abertura, todas as silagens apresentavam pH inferior ao pK_a do ácido acético. No quinto dia de exposição, observa-se que, nas silagens tratadas com doses acima de 1×10^5 UFC g/massa ensilada, os valores de pH encontravam-se inferiores a 4,73, conseqüentemente a estabilidade aeróbia foi mantida, bem como a população de fungos. No entanto as silagens tratadas com doses inferiores a essa tiveram a estabilidade aeróbia quebrada (Figura 1) e população de leveduras elevada. No caso das silagens-controle, neste dia o pH já se encontrava acima de 4,73. Nessa situação o ácido acético já se encontrava na forma dissociada, impedindo sua entrada na célula dos fungos. Um caso especial foi o observado nas silagens tratadas com a dose de 5×10^4 UFC g/massa ensilada. No quinto dia, tais silagens já apresentavam a quebra da estabilidade (Figura 1) e a população de leve-

aduras elevada, todavia seu pH estava inferior ao pK_a do ácido acético. Possivelmente, a dose de *L. buchneri* utilizada nessa condição não foi capaz de produzir ácido acético suficiente para efetuar o controle da população de fungos.

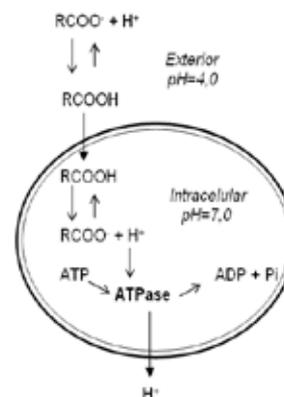


FIGURA 2. Transformações do ácido orgânico em ambiente de baixo pH e na presença da célula microbiana. Fonte: DAVIDSON (1997).

As silagens tratadas com doses iguais ou superiores a 1×10^5 UFC g/massa ensilada apresentaram elevação dos valores de pH acima do pK_a do ácido acético no décimo dia de exposição. Conseqüentemente nesse tempo foi observada quebra da estabilidade (Figura 1) e elevação da contagem de fungos (Tabela 3).

CONCLUSÕES

A inoculação da silagem de grão úmido de milho com dose de *L. buchneri* de 1×10^5 UFC/g de massa ensilada mostrou-se eficaz no controle de leveduras e fungos e promoveu aumento na estabilidade aeróbia. Doses superiores à supracitada possuem efeito benéfico. Contudo, é necessário considerar a relação custo-benefício.

A aplicação da bactéria heterofermentativa (*L. buchneri*) até a concentração de 4×10^5 UFC g/massa ensilada não influenciou os valores de pH, as perdas por gás e por efluente e a recuperação de matéria seca durante a fermentação das silagens de grãos úmidos de milho.

REFERÊNCIAS

- BUTLER, G.W.; BARLEY, R.W. **Chemistry and biochemistry of herbage**. London: Academic Press, 1973. v. 3. 295 p.
- CHANDLER, P.T.; MILLER, C.N.; JAHN, E. Feeding value and nutrient preservation of high moisture corn ensiled in conventional silos for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 682-688, 1974.
- COSTA, C.; ARRIGONI, M.D.B.; SILVEIRA, A.C. Silagem de grãos úmidos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 7., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 69-88.
- DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTEVILLE, T. J. (Ed.). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p. 520-556.
- DeBRABANDER, D.L.; COTTYN, B.G.; BOUCQUE, V. Substitution of concentrates by ensiled high-moisture maize grain in dairy cattle diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 38, p. 57-67, 1992.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 583-594, 1999.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 818-826, 2004.
- FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1080-1086, 2003.
- GOODRICH, R.D.; BYERS, F.M.; MEISKE, J.C. Influence of moisture content, processing and reconstitution on the fermentation of corn grain. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 876-881, 1975.
- HAIGH, P. M. Effluent production from grass silages treated with additives and made in large-scale bunker silos. **Grass and Forage Science**, v. 54, p. 208-218, 1999.
- JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W. Utilização de silagem de grãos de cereais na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM, 2001. p.146-176.
- JOBIM, C. C.; REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A. Avaliação da silagem de grãos úmidos de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 311-315, 1997.
- JOBIM, C. C.; REIS, R. A.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P. Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum**, v. 21, p. 671-676, 1999.
- KUNG JR., L.; TAYLOR, C. C.; LYNCH, M. P.; NEYLON, J. M.. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 336-343, 2003.
- KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003. p. 251-304.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340 p.
- MOON, N.J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 453-460, 1983.
- OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S. F.; FABER F.; DRIEHUIS, F. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 125-132, 2001.
- PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; SPOELSTRA, S.F.. Microbiology of ensiling In: BUXTON, D.R. et al. (Ed.). **Silage science and technology**. Madison: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 2003. p. 31-94.
- PETIT, H.V.; VIEIRA, D.M. Effect of grain level and protein source on ruminal fermentation, degradability, and digestion in milking cows fed silage. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2256-2267, 1991.
- PRIGGE, E.C.; JOHNSON, R.R.; OWENS, F.N.; WILLIAMS, D.E. Utilization of nitrogen from ground high

- moisture and dry corn by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 43, p.705-710, 1976.
- RANJIT, N.K.; KUNG J.L. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 526-535, 2000.
- RANJIT, N.K.; TAYLOR, C.C.; KUNG J.L. Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of maize silage. **Grass and Forage Science**, v. 57, p. 73-81, 2002.
- REIS, W. dos; JOBIM, C. C.; MACEDO, F. de A.; MARTINS F, E. N.; CECATO, U.; SILVEIRA, A. da. Desempenho de cordeiros terminados em confinamento, consumindo silagens de milho de grãos com alta umidade ou grãos de milho hidratados em substituição aos grãos de milho seco da dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 596-603, 2001.
- SANTOS, C.P.; FURTADO, C.E.; JOBIM, C.C. Avaliação da silagem de grãos úmidos de milho na alimentação de equinos em crescimento: valor nutricional e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p.1214-1222, 2002.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.
- TAYLOR, C.C.; KUNG JR., L. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn in laboratory silos. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p.1526-1532, 2002.
- WEINBERG, Z.G.; MUCK, R.E. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 53-68, 1996.
- WOOLFORD, M.K. A review: the detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p.101-116, 1990.
- WOOLFORD, M. K. Some aspects of the microbiology and biochemistry of silage making. **Herbage Abstracts**, v. 42, p.105-111, 1972.

Protocolado em: 4 maio 2007. Aceito em: 19 maio 2008.